

Clostridium difficile assosiert sykdom

- evaluering av diagnostikk og klinikk ved et universitetssykehus.

Mohammad Osman Pervez



Prosjektoppgave Medisinsk fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Desember 2006

Abstract

Objectives: this study was undertaken to find out the role of stool culture and toxin A and B detection in the diagnosis of AAD due to *Cl.difficile*. We wanted to know which of these two methods could be the most optimal procedure in combination with toxin A detection test to provide the most accurate diagnosis among hospitalized patients. An evaluation of the riskfactors and current treatment at our hospital was also performed.

Methods: Over a period of 14 months, 767 liquid or semi-liquid faecal samples from hospitalized patients suspected for CDAD were collected. All samples were tested with Toxin A/B test by ELISA (Meridian Bioscience), and cultured on cycloserin cefoxitim fructose agar stored anerobically. Colonies were identified by standard laboratory techniques, and further tested with toxin A/B test and toxin A test (Oxoid) to confirm their toxigenicity, and the presence of toxin A negative/toxin B positive strains.

Results: A total of 65 samples from 46 patients tested positive using the Toxin A/B test, and 26 were positive on culture. All 26 colonies were toxin-producing. Twentythree of the samples were positive on all 3 tests. Interestingly 13 (20%) samples were Toxin A/B positive and Toxin A negative, indicating the presence of toxin A-/B+ strains of *Cl.diff*. Three patients recieved no antibiotics but chemotherapy prior to infection.

Conclusion: Detection of *Cl.diff*. by culture did not prove to be a sensitive method in our study, obviously due to poor sending and storing techniques of samples, prior to application on agar. Toxin A/B test could be important in identifying toxin A-/B positive strains of *Cl.diff*. A relatively large proportion of patients recieved meropenem prior to infection, an antibiotic not widley used in CDAD, but increasingly administered at our hospital. Conservative and specific use of antibiotics in correct dosages should always be employed, and should decrease the incidence of AAD and thereby CDAD.

Innhold

ABSTRACT	2
INNHold	3
1. INTRODUKSJON.....	4
2. MATERIALE OG METODER.....	6
3. RESULTATER.....	8
4. DISKUSJON	13
KILDELISTE.....	16

1. Introduksjon

Clostridium difficile (Cl.dif.) er en anaerob, spore-dannende stavformet bakterie, som finnes i jord og i tarmen hos mennesker og dyr [1]. Bakterien er hos mennesket den vanligste årsaken til antibiotika assosiert diare [2, 3]. De fleste pasienter med Cl.dif. infeksjon har nylig brukt antibiotika, oftest cefalosporiner, clindamycin eller bredspektrede penicilliner [4]. Kjemoterapi er også en viktig risikofaktor, likeledes høy alder og lang sykehusopphold [5]. Symptomene kan variere fra løs avføring til en alvorlig pseudomembranøs kolitt med toksisk megacolon [6, 7]. Pseudomembranøs colitt er en tilstand med høy dødelighet. Det er rapportert en mortalitetsrate på opp til 25% hos eldre pasienter med Cl.dif. infeksjon, og 10-30% hos pasienter som utvikler pseudomembranøs kolitt [8]. Siden oppdagelsen i 1935 av Cl.dif. av Hall O'Toole [9], har denne bakterien vært gjenstand for en rekke studier. Det var først og fremst assosiasjonen mellom antibiotika bruk og pseudomembranøs kolitt som satte søkelyset på bakteriens virulensfaktorer [10,11]. Bakterien produserer to klinisk viktige toksiner: *toksin A* og *toksin B* [12-14]. Toksin A er et potent eksotoksin med vevsødeleggende og cytotoksisk virkning. Toksin B regnes å være 1000 ganger mer cytotoksisk enn toksin A. I følge publiserte teorier skal disse toksinene virke synergistisk [15]. I midlertidig har en også oppdaget toksin A negative (A-) /toksin B positive (B+) arter, som gir den samme symptomatologien som toksin A+/B+ arter forårsaker. Dette indikerer nødvendigheten av bruk av diagnostiske tester som ikke bare påviser toksin A, men også det uavhengige toksin B [3]. Dette er spesielt vesentlig hos barn med inflammatorisk tarmsykdom, hvor årsaken til Cl.dif assosiert diaré i stor andel utgjøres av toksin B produserende (toksin A negative) stammer [16].

Det finnes i dag flere metoder som kan hjelpe oss i diagnostikken av Cl.dif. assosiert sykdom: dyrkning, toksin påvisning (toksin A, B eller A+B), påvisning av toksinets DNA, og kolonoskopi [3, 6, 17]. Gullstandarden regnes i dag for å være dyrkning med toksinpåvisning (*cellculture cytotoxin assay*). I midlertidig er denne testen dyr og tidkrevende, og utføres bare ved større sykehus på verdensbasis.

Ved Rikshospitalet i Oslo ble det inntil sommer av 2004 kun testet på toksin A i fæces ved spørsmål om Cl.dif. infeksjon. Sensitiviteten ved denne testen er begrenset (ca. 50% [18]), og den kan øke ved å samtidig utføre andre diagnostiske tester som dyrkning og toksin A+B

test. Målet med dette prosjektet var å sammenligne to diagnostiske metoder for påvisning av *Cl.dif.* infeksjon. Vi vil i denne studien undersøke om det er toksin A+B test eller dyrkning (med etterfølgende toksin A+B test av suspekterte kolonier) som identifiserer flest syke, og dermed egner seg til en eventuell fremtidig kombinasjon med toksin A test i diagnostikken av *Cl.difficile*-assosiert sykdom. Det ble også utført toksin A test på toksin A+B positive prøver for å undersøke forekomsten av rene toksin B positive stammer.

2. Materiale og Metoder

Studien ble utført ved Institutt for Mikrobiologi ved Rikshospitalet i perioden 15. november 2004 til 15. januar 2006. Alle avføringsprøver hvor det ble rekvirert Cl.dif. toksiner ble inkludert i studien, bortsett fra pasienter under 18 måneder, og dersom avføring var formet ved ankomst til laboratoriet.

Avføringsprøvene ble oppbevart i kjøleskap ved 4 grader celsius i sterile beholdere. Analysene ble utført mandag, onsdag og fredag hver uke. Analysemetodene vi benyttet var 1) Cl. dif. immunocard toksin A test ved ELISA (Oxoid Fisher Scientific International, Hampshire), 2) Cl.dif. immunocard toksin A og B test ved EIA (Meridian Bioscience, Europe), og 3) dyrkning på selektiv Cl. dif. medium (=CCFA spesialmedium: cycloserin, cefoxitim, fructose agar). Alle prøvene ble testet for toksin A+B og dyrket anaerobt. Prøvene som ble funnet positive for toksin A+B ble så testet for toksin A.

A) toksintester:

Immunocard toksin A+B test er en rask, kvalitativ, horisontal-flow enzyme immunoassay (EIA) for påvisning av Cl.dif. toksin A og B i human fæces, og ble utført etter produsentens instruksjer. Fæcesprøven blandes med en oppløsningsvæske, og et enzyme-konjugat som inneholder antistoffer mot toksin A og B. Blandingen innkuberes i 5 min. Toksin-antistoffer i konjugatet vil binde seg til toksin A og B om de er tilstede. Deretter overføres noe av denne blandingen til to brønner, henholdsvis en kontrollbrønn og en testbrønn. Dette innkuberes for ytterligere 5 min ved 20-26 grader celsius. Toksin-antistoff komplekset separeres så fra resten av prøvematerialet, idet prøven vandrer langs reaksjonsmembranen mot immobiliserte anti-toksin antistoffer i resultat- og kontrollbrønnene på den andre siden av testkortet. Dermed vil toksin-antistoff komplekset felles. Begge brønnene vaskes og tilføres et ”substrat reagens” som skal virke i 5 min før avlesning av testresultatet. Dette reagenset bindes til det utfelte toksin-antistoff komplekset, og danner en blå farge. Ved positiv test (toksin A og/eller toksin B positiv stamme) skal begge resultatbrønnene bli blå. Ved negativ test er det kun kontrollbrønnen som blir blå, som indikasjon på teknisk riktig utført test.

Immunocard toksin A-test er en rask, kvalitativ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for påvisning av Cl. dif. toksin A i human avføring. En prøve av fæces blandes med

en oppløsningsvæske og sentrifugeres i 10 minutter. Deretter overføres noe av supernatanten til brønner på testkortet. Er toksin A tilstedet i prøven, vil spesifikke toksin A antistoffer merket med blå latexpartikler binde seg til toksin A, og vandre langs teststrimmelen. Dette komplekset vil deretter felles av immobiliserte anti-toksin A antistoffer under resultat vinduet, og en blå stripe dannes. Dette indikerer et positivt resultat, altså tilstedeværelse av toksin A produserende stamme. Ved fravær av toksin A i prøven vil det ikke dannes komplekser og stripen dannes ikke. En blå kontrollstripe bør alltid være synlig i kontrollvinduet som bekreftelse på riktig gjennomført test.

B) Dyrkning

Alle avføringsprøvene som ble inkludert i studien ble dyrket på anaerobiserte CCFA-skål. Disse skålene inneholder Cl.dif. agar, som er et næringsrikt medium som inneholder defibrinert hesteblood, peptoner og fruktose. For å gjøre mediet selektivt er det tilsatt D-cycloserin og cefoxitin. Derved hemmes Enterobacteriaceae, enterokokker, stafylokokker, gram-negative anaerobe staver samt andre Clostridium-arter enn Cl.dif. Etter utsæd ble skålene inkubert anaerobt i totalt 72 timer, og avlest etter 48- og 72 timer. Suspekterte kolonier ble identifisert som Cl. Difficile på bakgrunn av koloniutseende, lukt, enzymaktivitet, metronidazol-følsomhet og mikroskopi. Endelig ble koloniene testet på toksin A+B (Meridian Bioscience, Europe).

Retrospektivt ble journalopplysninger fra pasienter som testet positivt ved minst en av disse testene studert med vekt på følgende variabler: kjønn, alder, sykehusavdeling, risikofaktorer, symptomer og behandling.

3. Resultater

Studien inkluderer journalgjennomgang av Cl.dif. positive pasienter diagnostisert i vår studieperiode. Det var totalt 46 pasienter hvis avføring ble analysert, og totalt 65 avføringsprøver som var positive ved en eller flere tester. Altså ble det analysert 19 positive avføringsprøver som var fra pasienter med tidl. diagnostisert Cl.dif. infeksjon.

Journalopplysninger av én pasient var ikke tilgjengelig. Det er derfor 45 journaler som er lagt til grunn i vurderingen av den kliniske delen av dette studiet.

Av 767 avføringsprøver som ble innsendt til undersøkelse, var 702 (91,5%) negative på alle 3 tester, og 65 (8,5%) positive ved minst en av de tre testmetodene (se tabell 1). Sekstifem (8,5%) var sikre toksin A+B positive og 8 (1,5%) usikre. Ved dyrkning var det oppvekst av Cl.dif. i 26 (3,4%) av de til sammen 767 avføringsprøvene. Alle koloniene var toksinproduserende (toksin A og/eller toksin B positive). Det foreligger ingen dyrknings svar på 12 av fæces-prøvene. De usikre svarene regnes som negative i den videre fremstillingen.

Av de 65 positive avføringsprøvene var 23 (35,4%) prøver positive på alle tre tester. Tjueni (44,6%) prøver var både toksin A+B og toksin A positive, men dyrkningsnegative. 3 (4,6%) var toksin A+B og dyrkningspositive, men toksin A negative. Ti (15,4%) var toksin A+B pos, og toksin A- og dyrkningsnegativ (se tabell 2). Ingen av prøvene tilhørte kategoriene ”toksin A+B neg., toksin A pos., dyrknings pos.” eller ”toksin A+B neg., toksin A neg., og dyrkningspos. ”.

Av pasienter med påvist CDAD var det 26 (57,8%) kvinner. Tjue (44,4%) var over eller lik 50 år. Det ble observert og hjertesykdom hos 11 (24,4%), og nyresykdom hos 10 (22,2%) pasienter. Åtte (2,2%) hadde leversykdom, og 7 (15,6%) hadde diabetes mellitus før de fikk Cl.dif. infeksjon.

Førtito av 45 pasienter hadde brukt antibiotika. Fjorten (33,3%) hadde fått cefotaxim. Den nest hyppigste årsaken til antibiotika-assosiert diare i denne studien var meropenem: 11 (26,2%) pasienter totalt. Andre antibiotika var: trimetoprim-sulfamethoxazol (6 pas., 14,3%), ampicillin (5 pas., 11,9%), clindamycin (3 pas., 7,1%), erytromycin (2 pas., 4,8%), og dicloxacillin (1 pas., 2,4%). Tre pasienter fikk kjemoterapi som monoterapi, før utvikling av Cl.dif. infeksjon.

Trettiseks (80%) av pasientene hadde moderat diaré (7-10 avføringer per dag) og 9 (20%) hadde alvorlig diaré (>10 avføringer per dag). 20 (44,4%) av pasientene hadde i tillegg blod og/eller slim i avføring. Åtte (17,7%) av pasientene utviklet pseudomembranøs kolitt diagnostisert ved kolonoskopi. I tillegg til diaré hadde 38 (84,4%) av pasientene magesmerter som en vesentlig del av symptombildet, 31 (68,9%) hadde feber, og 12 (26,7%) pasienter hadde kvalme og oppkast.

Tretten (33,3%) av pasientene responderte på monoterapi med metronidazol for Cl.dif. infeksjon, og 13 på kombinasjonsbehandlingen metronidazol/vankomycin. Ti (22,2 %) hadde god respons på vancomycin alene, 2 (4,4%) ble klinisk symptomfrie kun ved seponering av all antibiotikabehandling, og 1 (2,2%) pasient med langvarig og terapieresistent Cl.dif. infeksjon, ble behandlet med instillering av fæces. Tre (6,7%) av pasientene døde av Cl.dif. infeksjon som medvirkende årsak, før en kunne vurdere eventuell behandlingseffekt. Ytterligere 3 (6,7%) manglet journalopplysninger vedrørende behandling for Cl.dif. infeksjonen.

Sykehusavdelingen med størst insidens var anesthesiavdelingen med til sammen 9 (20,0%) tilfeller av Cl.difficile infiserte pasienter. Andre sykehusavdelinger med relativ stor utbredelse var hjertemedisinsk- og nevrokirurgisk avd., hver med 7 (15,6%) tilfeller i løpet av studieperioden. Gastrokirurgisk- og nyremedisinsk avdeling hadde hver 5 (11,1%) tilfeller, thoraxkirurgisk avdeling 4 (8,9%), og gastro-og lungemedisinsk avdeling hadde 3 (6,7%) tilfeller hver. Pediatrisk avdeling hadde lavest forekomst med kun 2 (4,4%) tilfeller (se figur 1).

Tabell 1. Antall positive og negative CDIF analyser vurdert ved toksin A+B test og dyrkning.

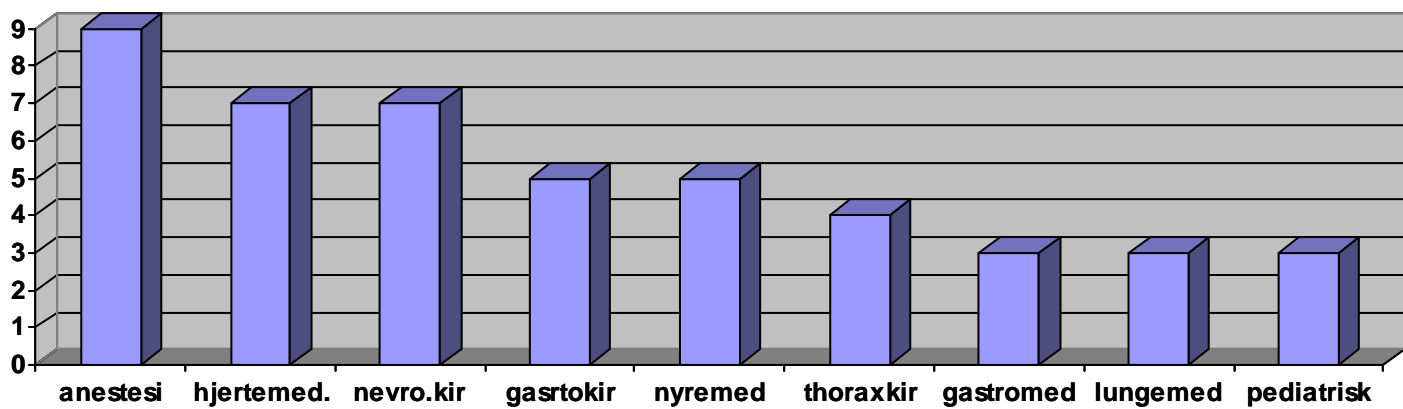
Tox. A+B	Dyrkning med toksin A+B pos. test
----------	---

Positive:	Sikre:	Sikre:
	65	26
	Usikre:	Usikre:
	8	0
Negative:	697	747

Tabell 2. Antall positive prøver vurdert ut i fra tre ulike tester: toksin A+B test, toksin A test, og dyrkning med toksin A+B test.

Tox A+B pos.	Tox A+B pos	Tox A+B pos.	Tox A+B pos.
Tox A pos.	Tox A pos	Tox A neg.	Tox A neg.
Dyrkning med toksin A+B pos.:	Dyrknings neg.:	Dyrknings pos.:	Dyrknings neg:
23	29	3	10

Figur 1. Forekomsten av Cl.dif. infeksjon i de ulike sykehusavdelingene



4. Diskusjon

Cellekultur cytotoksin assay regnes å være gullstandard for påvisning av Cl. dif. i avføring, pga. testens høye sensitivitet og spesifisitet [19,20]. Men testen er for øvrig ikke fullt standardisert, den er tidkrevende (inkubasjonstid på 48 timer), og brukes ikke ved norske laboratorier.

I løpet av studieperioden som varte i 14 måneder ble det diagnostisert 46 tilfeller av Cl.dif. assosiert sykdom (CDAD), noe som tilsvarer en gjennomsnittlig forekomst på omtrent 3 tilfeller i måneden.

Av de totalt 65 positive prøvene var 52 prøver positive på både toksin A+B testen og toksin A testen. Imidlertid var 13 andre prøver positive på toksin A+B testen, men negative på toksin A testen. Av dette kan vi dedusere at 13 (20%) av alle de positive prøvene inneholdt rene toksin B produserende stammer.

Isolering av Cl. dif. ved dyrkning har høy sensitivitet og spesifisitet; de fleste oppgir en sensitivitet på omkring 98% og spesifisitet på 93% [21,22]. På den andre siden krever denne metoden en inkubasjonstid på 48 timer, og differensierer ikke mellom toksigene og ikke-toksigene stammer. Ved å utføre toksin A og toksin A+B test på disse koloniene, evt. PCR, kan en finne de laboratoriemessige toksinproduserende stammene, men dette skiller ikke mellom en bærertilstand og en in vivo toksin produksjon. Vi fikk i alt oppvekst av 26 toksigene Cl.dif. kolonier. Dette er relativt lite i forhold til antall positive ved toksin A testen (65 tilfeller) og det som angis i litteraturen. Årsaken kan ligge flere steder. Det optimale mediet for forsendelse er Stuart-medium. På vårt sykehus ble det benyttet sterile plast beholdere uten tilsetningsmidler. Cl.dif. er en bakterie som krever strikt anaerobe forhold for å overleve. Avføringsprøvene ble bevart i kjøleskap i opptil 72 timer før de ble dyrket, mens den optimale tiden angis å være 0 timer.

På den andre siden blir dagens medisin stadig mer opptatt og kanskje avhengig av raske, sensitive, nøyaktige og billige testmetoder. Disse nye toksin testene sørger for testresultater oppnådd innen 20-40 min etter mottatt prøve, krever kun ett prøvemateriale, er enkle å gjennomføre, og kan utføres så raskt laboratoriet mottar prøven. Testene har dessuten høy spesifisitet, noe som gjør dem egnet til screeningsundersøkelser. Vi fant i tillegg at 13 (20%)

tilfeller av CDAD skyldtes forekomsten av toksin A-/B+ stammer. Dette er relativt nytt i den vestlige del av verden. I en studie fra Japan hadde 6% av pasientene CDAD på grunn av toksin A-/B+ stammer [5]. Disse stammene gir samme type symptomer som toksin A+/B+ stammer, og dette var også tilfelle i vår studie. Det er foreløpig ikke bekreftet om disse stammene har andre risikofaktorer, men antydning at kjemoterapeutiske og immunosuppressive medisiner kanskje kan øke risikoen. Blant våre pasienter var det 3 som utviklet CDAD pga. kjemoterapi, og 2 av dem var toksin A negative. Uansett konklusjon indikerer slike funn nødvendigheten for bruk av metoder som også kan påvise disse stammene, for eksempel toksin A+B testen [16].

Som beskrevet i litteraturen, hadde de aller fleste av pasientene med diagnostisert Cl.dif. infeksjon brukt antibiotika. Kun 3 av 65 pasienter fikk kjemoterapi før de utviklet CDAD. Ampicillin, cefalosporiner og aminoglykosider er velkjente årsaker til antibiotika-assosiert diare (AAD) [23, 24, 25]. Dette korresponderer også godt med våre resultater. Andre antibiotika er fluorkinoloner, som av noen sykehus regnes som den viktigste risikofaktoren [26]. Det oppsiktsvekkende i denne studien var i midlertidig meropenem som hyppig årsak til AAD: 26,2% av pasientene med AAD fikk meropenem i monoterapi og ble infisert med Cl.dif. Årsaken til denne observasjonen kan være sparsom bruk av meropenemer i resten av verden. Uansett er det på dette sykehuset observert en tendens til økende bruk av denne typen antibiotika.

Moderat diaré, feber og magesmerter er viktige symptomer på CDAD, mens alvorlig diare, oppkast og avføring med eller uten blod/ slim varierer med alvorlighetsgrad. Det er lite sannsynlig at en pasient under antibiotika behandling har CDAD, om vedkommende samtidig ikke har moderat mengde diaré eller magesmerter [27]. Thompson et al. [28] rapporterte feber, magesmerter og abdominal distensjon som de predomante symptomer. Andre studier har også oppgitt tempertaurer over 37,8 og slim i avføring som signifikante prediktorer for Cl.dif. infeksjon. Dette korresponderer godt med våre observasjoner.

Behandling for CDAD er metronidazol og vankomycin; 92,3% av våre pasienter responderte på metronidazol eller vankomycin som monoterapi, eller i kombinasjon.

Cl. Difficile assosiert diare (CDAD) er hyppigst observert blant hospitaliserte pasienter over 50 år som har brukt antibiotika [29]. Imidlertid var 44,4% av pasientene i vår studie 50 år eller eldre. Vurdering av varighet av sykehusopphold som risikofaktor for CDAD, oppgis

ulikt fra studie til studie [30, 31]. Albumin nivå under 3 g/dL og bruk av syrepumpehemmere er to andre viktige risikofaktorer for CDAD [31]. Disse parametrene ble ikke studert i vår studie.

Hos oss gav dyrkning ingen gevinst – sannsynligvis på grunn av svikt i forsendelse og oppbevaring før utsæd. A+B testen kan være viktig for identifiseringen av toksin A-/B+ stammer. Klinisk var funnene som antatt, men med relativ stor andel pasienter behandlet med meropenem. Prinsippet med å behandle med spesifikke antibiotika og i riktig dosering må aldri undervurderes

Kildeliste

1. Berit Hovig og Terje Olav Rød: Anaerobe Gram-negative stavbakterier. I: Degré M, Hovig B, Bukholm G og Rollag H (red.): Medisinsk mikrobiologi. ISBN:82-00-45056-2, Gyldendal, Oslo 2000.
2. Snell H, Ramos M, Longo S, John M, Hussain Z: Performance of the TechLab *C.DIFF* CHEK-60 Enzyme Immunoassay (EIA) in Combination with the *C.difficile* Tox A/B II EIA Kit, the Triage *C.difficile* Panel Immunoassay, and a Cytotoxin Assay for Diagnosis of *Clostridium difficile*-Associated Diarrhea. J Clinical Microbiology Oct. 2004; 42: 4863-4865.
3. Morelli MS, Rouster SD, Giannella RA, Sherman KF: Clinical application of polymerase chain reaction to diagnose *Clostridium difficile* in hospitalized patients with diarrhea. Clin Gastroenterol Hepatol. Aug 2004; 2(8): 669-74.
4. Palmore TN, Sohn S, Malak SF, Eagan J, Sepkowitz KA: Risk factors for acquisition of *Clostridium difficile*-associated diarrhea among outpatients at a cancer hospital. Infect Control Hosp Epidemiol. 2005 Aug; 26(8): 672-5.
5. Katz DA, Lynch ME, Littenberg B: Clinical prediction rules to optimize cytotoxin testing for *Clostridium difficile* in hospitalized patients with diarrhea. Am J Med. 1996 May; 100(5): 487-95.
6. Vanpoucke H, De Baere T, Clayes G, Vaneechoutte M and Verschraegen G: Evaluation of six commercial assays for the rapid detection of *Clostridium difficile* toxin and/or antigen in stool specimens. Clin Microbiol Infect 2001; 7; 55-64.
7. Moyenuddin M, Williamson JC, Ohl CA: *Clostridium difficile*-associated Diarrhea: Current Strategies for Diagnosis and Therapy. Current Gastroenterology Reports 2002, 4: 279-286.
8. Gronczewski CA, Johnson RW: *Clostridium Difficile* Colitis. eMedicine Aug. 2006; <http://www.emedicine.com/med/topic3412.htm>.
9. Hall IC, O'Toole E: Intestinal flora in newborn infants with a description of a new pathogenic anaerob, *Bacillus difficilis*. Am J Dis Child 1935; 49: 390-402.
10. Reiner L, Sclesinger MJ, Miller GM: Pseudomembranous colitis following aureomycin and chloramphenicol. Arch Pathol. 1952; 54: 39-67.

-
11. Tedesco FJ, Barton RW, Alpers DH: Clindamycin-associated colitis; a prospective study. *Ann Intern Med.* 1974; 81: 429-433.
 12. Tucker KD, Carrig PE, Wilkins TD: Toxin A of *Clostridium difficile* is a potent cytotoxin. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 869-871
 13. Norwood DA Jr, Sands JA: Physical map of the *Clostridium difficile* chromosome. *Gene* 1997; 201: 159-168.
 14. Moncrief JS, Barroso LA, Wilkins TD. Positive regulation of *Clostridium difficile* toxins. *Infect Immun* 1997; 65: 1105-1108.
 15. Lyerly DM, Saum KE, MacDonald DK, Wilkins TD: Effects of *Clostridium difficile* toxins given intragastrically to animals. *Infect Immun* 1985; 47: 349-352.
 16. Markowitz JE, Brown KA, Mamula P, Drott HR, Piccoli DA, Baldassano RN: Failure of single-toxin assay to detect clostridium difficile infection in pediatric inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 2001 Sep; 96(9): 2688-90.
 17. Bond F, Payne G, Borriello SP, Humphreys H: Usefulness of culture in the diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1995 Dec; 14(12): 1109-11.
 18. O'Connor D, Hynes P, Cormican M, Collins E, Corbett-Feeney G, Cassidy M: Evaluation of Methods for Detection of Toxins in Specimens of Feces Submitted for Diagnosis of *Clostridium difficile*- Associated Diarrhea. *J Clin Microbiol.* 2001 Aug; 39(8): 2846-9.
 19. Bartlett JG, Chang TW, Gwewith M, Gorbach SL, Onderdonk AB: Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. *N Engl J Med* 1978; 298: 531-4.
 20. Chang TW, Lauermann M, Bartlett JG: Cytotoxicity assay in antibiotic-associated colitis. *J Infect Dis* 1979; 140: 765-70.
 21. Shanholtzer CJ, Willard KE, Holter JJ, Olsen MM, Gerding DN, Peterson LR: Comparison of the VIDAS *Clostridium difficile* toxin A immunoassay with *Clostridium difficile* culture and cytotoxin and latex test. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1837-40.
 22. Peterson LR, Olson MM, Schanholtzer CJ, Gerding DM: Results of a prospective 18 months clinical evaluation of culture, cytotoxin testing, and Culturette Brand (CDT) latex testing in the diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1988; 10: 85-91.

-
23. Rodrigues C, Menon S, Nukala R, Mehta AP: Detection of *Clostridium difficile* toxin A by an enzyme immunoassay. Indian J Med Microbiol 1997; 15: 17-9.
 24. Dutta P, Niyogi SK, Mitra U, Rasaidy R, BhattacharyaMK, Charaborty S, et al. *Clostridium difficile* in antibiotic-associated pediatric diarrhea. Indian Pediatr 1994; 31: 121-6.
 25. Zadik PM, Moore AP: Antibiotic associations of an outbreak of diarrhea due to *Clostridium difficile*. J Hosp Infect 1998; 39: 189-93.
 26. Al-Tureihi FI, Hassoun A, Wolf-Klein G, Isenberg H: Albumin, length of stay, and proton pump inhibitors: key factors in *Clostridium difficile*-associated disease in nursing home patients. J AM Med DirAssoc. 2005 Mar-Apr; 6(2): 105-8.
 27. O'Connor D, Hynes P, Cormican M, Collins E, Corbett-Feeney G, Cassidy M: Evaluation of Methods for Detection of Toxins in Specimens of Feces Submitted for Diagnosis of *Clostridium difficile*- Associated Diarrhea. J Clin Microbiol. 2001 Aug; 39(8): 2846-9.
 28. Thompson CM Jr, Gilligian PH, Fisher MC, Long SS: *Clostridium difficile* cytotoxin in a pediatric population. Am J Dis Child 1983; 137: 271-4.
 29. Shehabi AA, Abu-Ragheb HA, Allaham NA: Prevalence og *Clostridium difficile* associated diarrhea among hospitalized Jordanian patients. East Mediterr Health J, 2001 Jul-Sep; 7(4-5): 750-5.
 30. Brown E, Talbot GH, Axelrod P, Provencher M, Hoegg C: Risk factors for *Clostridium difficile* toxin-associated diarrhea. Infect Control Hosp Epidemiol 1990 Jun; 11(6): 283-90.
 31. Al-Tureihi FI, Hassoun A, Wolf-Klein G, Isenberg H: Albumin, length of stay, and proton pump inhibitors: key factors in *Clostridium difficile*-associated disease in nursing home patients. J AM Med DirAssoc. 2005 Mar-Apr; 6(2): 105-8.